

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 21620111152373

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# 海洋微生物小分子代谢产物提取制备工艺 研究

Technolog of extraction and preparation of fraction of small  
molecule metabolites from marine microbe

廖 云 莉

指导教师姓名: 徐 洵 院 士

许 晨 研究员

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2014 年 04 月

论文答辩时间: 2014 年 05 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2014 年 05 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（许 晨）课题（组）的研究成果，获得（许晨）课题（组）经费或实验室的资助，在（许 晨）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 目 录

摘 要.....	IX
ABSTRACT.....	III
第一章 前言 .....	5
1.1 海洋微生物小分子代谢产物 .....	5
1.1.1 海洋微生物的特点.....	5
1.1.2 海洋微生物小分子代谢产物研究现状.....	5
1.2 微生物发酵液的预处理 .....	2
1.2.1 预处理的必要性.....	2
1.2.2 发酵液预处理方法 <sup>[21]</sup> .....	3
1.3 发酵液粗提物指纹图谱表征 .....	5
1.3.1 指纹图谱表征的意义.....	5
1.3.2 指纹图谱的获取方法.....	5
1.4 发酵液中小分子代谢产物的提取方法 .....	6
1.4.1 溶剂萃取法.....	6
1.4.2 离子交换法.....	6
1.4.3 吸附法.....	6
1.4.4 沉淀分离法.....	7
1.5 小分子代谢馏分制备方法 .....	8
1.5.1 低压制备色谱(LPLC) <sup>[61]</sup> .....	8
1.5.2 中压制备色谱 (MPLC) .....	9
1.5.3 高压制备色谱 (HPLC) .....	10
1.6 研究目的、内容与意义 .....	10
第二章 发酵液的预处理工艺研究 .....	12
2.1 材料与方法 .....	12
2.1.1 材料.....	12

2.1.2 方法.....	13
<b>2.2 结果与分析 .....</b>	<b>14</b>
2.2.1 絮凝剂.....	14
2.2.2 絮凝条件的确定.....	17
2.2.3 海洋细菌发酵液固液分离方法的探究.....	19
2.2.4 对放线菌发酵液絮凝效果考察.....	21
<b>2.3 小结 .....</b>	<b>22</b>
<b>第 3 章 深海来源微生物小分子代谢物的提取富集以及初步纯化 .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 材料与方法 .....</b>	<b>23</b>
3.1.1 材料与仪器.....	23
3.1.2 方法.....	24
<b>3.2 结果与分析 .....</b>	<b>27</b>
3.2.1 大孔吸附树脂.....	27
3.2.2 串联树脂吸附条件确定.....	34
3.2.3 串联树脂洗脱条件确定.....	41
<b>3.3 小结 .....</b>	<b>50</b>
<b>第四章 指纹图谱表征以及中压制备方法研究 .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 材料与方法 .....</b>	<b>51</b>
4.1.1 材料.....	51
4.1.2 方法.....	52
<b>4.2 结果与分析 .....</b>	<b>54</b>
4.2.1 指纹图谱表征.....	54
4.2.2 中压馏分制备方法研究.....	60
<b>4.3 小结 .....</b>	<b>71</b>
<b>第五章 结论 .....</b>	<b>73</b>
<b>展 望 .....</b>	<b>76</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>77</b>
<b>硕士期间的成果 .....</b>	<b>81</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>82</b>

## Contents

<b>Abstract</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	III
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Small molecule metabolites from marine microorganisms</b> .....	1
1.1.1 The characteristics of marine microorganisms .....	1
1.1.2 The research status of small molecule metabolites from marine microorganisms .....	1
<b>1.2 The pretreatment of fermenttation broths from microorganisms</b> .....	2
1.2.1 The necessity of pretreatment .....	2
1.2.2 The pretreatment method of fermenttation broths .....	3
<b>1.3 The fingerprint representation of crude extracts from fermenttation broths</b> .....	5
1.3.1 The significance of the fingerprint representation .....	5
1.3.2 The method of getting the fingerprints .....	5
<b>1.4 The extraction method of small molecule metabolites from fermentation         broths</b> .....	6
1.4.1 Solvent extraction method .....	6
1.4.2 Ion exchange method .....	6
1.4.3 Adsorption method .....	6
1.4.4 Precipitation separation method .....	7
<b>1.5 Separation of small molecule metabolites</b> .....	8
1.5.1 Low Pressure Liquid Chromatography (LPLC) .....	8
1.5.2 Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) .....	9
1.5.3 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) .....	10

1.6 The purpose, contents and significance of this work .....	10
<b>Chapter 2 The technolog Of Pretreating Fermentation Broths .....</b>	<b>12</b>
2.1 Materials and methods .....	12
2.1.1 Materials .....	12
2.1.2 Methods.....	13
2.2 Results and analysis .....	14
2.2.1 Flocculants .....	14
2.2.2 The detemination of flocculation conditions .....	17
2.2.3 Study on solid-liquid separation methods for marine bacteria broths .....	19
2.2.4 The investigation of effects of flocculation to actinomycetes broths .....	21
2.3 Summary.....	22
<b>Chapter 3 Extraction and enrichment of deep-sea microbial small molecule metabolites and preliminary purification.....</b>	<b>23</b>
3.1 Materials and methods .....	23
3.1.1 Materials and instruments .....	23
3.1.2 Methods.....	24
3.2 Results and analysis .....	27
3.2.1 Macroporous resins.....	27
3.2.2 The detemination of adsorption conditions of resins in-series .....	34
3.2.3 The detemination of desorption conditions of resins in-series .....	41
3.3 Summary.....	50
<b>Chapter 4 Study on fingerprint representations and separation using MPLC method.....</b>	<b>51</b>
4.1 Materials and methods .....	51
4.1.1 Materials .....	51
4.1.2 Methods.....	52
4.2 Results and analysis .....	54
4.2.1 The fingerprint representations .....	54

4.2.2 Study on the method of preparing fractions in MPLC.....	60
4.3 Summary.....	71
<b>Chapter 5 Conclusions.....</b>	<b>73</b>
<b>Prospect.....</b>	<b>76</b>
<b>References .....</b>	<b>77</b>
<b>Articles Published.....</b>	<b>81</b>
<b>Acknowledge.....</b>	<b>82</b>



## 摘 要

本论文主要是以海洋微生物发酵液为研究对象,探索海洋微生物小分子代谢产物高效率、高通量的提取和制备分离方法,建立海洋微生物小分子代谢产物馏分库以供活性药物的初步筛选,为最终建立海洋微生物小分子代谢产物活性化合物库奠定基础。具体内容如下:

第一:为提高过滤速率,对海洋细菌和放线菌发酵液进行预处理研究,主要以海洋细菌发酵液为研究对象,采用絮凝技术对发酵液进行预处理。以 610 nm 透光率、蛋白去除率、多糖去除率、过滤速度等为指标,从 8 种不同类型的絮凝剂中筛选出适合的絮凝剂,通过 HPLC 分析比较了两种絮凝剂对发酵液中小分子代谢产物提取的影响,并探讨了所筛选絮凝剂的使用条件。比较了 4 种固液分离方法对细菌发酵液的分离效果,进而确定了适合海洋细菌发酵液快速预处理的工艺。结果表明:硫酸铝耦合膜超滤法絮凝速度快、蛋白多糖去除率高、滤液澄清度好,不会造成粗提物中铝离子的残留量增加,适用于大部分海洋细菌发酵液的预处理。最佳使用 pH 值为 6,在 25 °C -45 °C 之间温度对其影响不大,发酵液中蛋白含量与硫酸铝用量存在一定的关系。通过验证,此法对放线菌发酵液预处理也是适宜的。

第二:以提取质量和 HPLC 指纹图谱为依据,对 3 类不同类型的 13 种大孔吸附树脂进行了筛选,以及组合搭配,通过质谱分析探究将筛选出的 3 种不同类型的树脂串联吸附是否具有优势,最后以 254 nm 吸光值变化趋势和 HPLC 跟踪分析对串联树脂的吸附以及解吸条件进行了初步探索。结果表明:将非极性大孔吸附树脂 DM11,中极性树脂 HPD400 和极性树脂 SD300 3 种不同类型的树脂串联,可以尽可能多的吸附发酵液中的小分子代谢产物,并可以节约树脂用量。DM11: HPD400: SD300 较适宜的搭配比例约为 2:2:3;确定的吸附条件为:吸附温度为 5°C,吸附 pH 值为 5,上样流速为 4 BV/h 时较适宜,放线菌上样量约为 10 BV,细菌约为 32 BV。确定的洗脱条件为:初步分段梯度点的甲醇水比例约为 50: 50;洗脱体积为水洗 2 BV、20%甲醇洗 2 BV、50%甲醇洗 1.8 BV、纯

甲醇洗 2 BV；洗脱流速为 1.5 BV/h 较适宜。

第 3：以分离度与分辨率为依据，从易分离极性化合物的四种高效液相分析色谱中筛选出了适宜的色谱柱，并对所筛选色谱柱的梯度条件进行了优化。结果表明：柱 4（NMU C18，4.6×250 mm，5 $\mu$ ）适合分离海洋微生物发酵液粗提物，采用梯度条件 3 能较好的兼顾极性部分与非极性部分化合物的分离。并采用 HPLC-PDA-ELSD 和 UPLC-PDA-Q-TOF MS 两套分析检测系统分别对粗提物进行指纹图谱表征，给出尽可能多的物化信息。

第四：以色谱峰的可重现性、色谱柱装填的可重复性以及色谱峰的分离度和峰形为指导依据，对干法与湿法两种制备柱装填方法的柱效进行了考察；以尿嘧啶、硝基苯和芴 3 种标准品对分析柱和制备柱进行柱效评价，对分析条件与制备条件的转化进行了初步探究；以发酵液粗提物为对象考察了 26×460 mm 制备柱的上样量；最后对分段制备是否可解决分离度的问题做了初步的考察。结果表明：制备柱采用干法装填的效果比较好；26×460 mm 的制备柱适宜的流速为 40 mL/min，起始梯度有机溶剂比例相对分析条件极性部分需下调 5%-10%，非极性部分约下调 5%，梯度运行时间可根据公式 4-4 进行转化；为保证一定的分离度，粗提物的上样量不超过 3 g 比较适宜。

关键词：海洋微生物；小分子代谢产物；预处理；大孔吸附树脂；制备

## ABSTRACT

A high throughput extraction and preparative separation technology was studied in this thesis. The purpose of this work is to establish small molecule metabolites fraction libraries for preliminary screening of bioactive substances. This work creates the foundation for building a library of active small molecule metabolites from marine microorganisms. More details are as follows:

Firstly, to improve the filtration rates, the technology of pretreating fermentation broths of marine bacteria and actinomycetes was studied. With marine bacteria as the main research objects, fermentation broths were pretreated by flocculation. The optimum flocculation was screened by comparing the light-transmittance at 610nm, the rates of filtration, the removal ratio of proteins and polysaccharoses from eight kinds of flocculations.  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  and poly- $\text{AlCl}_3$  were chosen as two candidates for further screening. The effects of their application on extracting small molecule metabolites from marine bacteria were investigated by HPLC (high performance liquid chromatography). The effects of four kinds of solid-liquid separation methods were compared to pretreat the fermentation broths of marine bacteria. The results were as follows: Using  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  as flocculant leads to rapid flocculation, high removal ratio of protein and polysaccharose, and pellucid filtration. The application of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  did not increase the Al content of crude extracts. The optimum flocculation pH is 6 and the optimum temperature range is 25°C to 45°C. The dosage of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  and the protein content of fermentation broths have some correlation. The method is adaptable to most marine bacteria. What is more, the pretreatment method is proved to be adaptive to actinomycetes.

Secondly, suitable resins were screened and combined from 13 different kinds of macroporous resins by comparing extract masses and HPLC fingerprints. The advantages of using three types of resins in group was studied by mass spectrometry. The adsorption and desorption conditions were optimized by monitoring the changing

trend of absorbance at 254nm and by comparing HPLC fingerprints. Results are as follows: the combination of three types of resins—DM11, HPD400, and SD300, can adsorb more small molecule metabolites from fermentation broths, and to some extent, can optimize the dosage of resins. The suitable collocation ratio of DM11:HPD400:SD300 is about 2:2:3. The optimal adsorption temperature is 5°C and the optimum pH values is 5. The suitable flow rate is 4 BV/h and the loading amount is about 10 BV for actinomycetes and 32 BV for bacteria. The optimal desorption conditions are as follows: the preliminary segmentation ratio of methanol and water is about 50:50, the desorption gradient and volume is successively water—2 BV, 20% methanol in water—2 BV, 50% methanol in water—1.8 BV, and methanol—2BV. The proper flow rate is 1.5 BV/h.

Thirdly, a suitable HPLC column is chosen from four kinds of columns, which are designed to separate polar compounds, by comparing their degree of separation and resolution. The gradient conditions were then optimized for this column. Results show that NMU C18 (4.6×250mm, 5μ) is satisfactory for the separation of crude extracts of marine bacteria and actinomycetes. The third gradient condition can separate polar compounds and nonpolar compounds very well. The fingerprints of crude extracts are characterized with HPLC-PDA-ELSD and UPLC-PDA-Q-TOF MS to offer more physico-chemical information.

Lastly, the preparative column efficiency is investigated with the dry and wet column packing method, by comparing the reproducibility of chromatographic peak, the repeatability of column packing, the degree of separation and peak symmetry. The feasibility of converting analysis conditions into preparative conditions is preliminarily studied by evaluation of column efficiency for both analysis column and preparative column with uracil, nitrobenzene and fluorine. Loading amount and preparation with segmentation are preliminarily studied. Results show that the dry column packing method is better than the wet method. For the 26×460 mm column, the proper flow rate is 40 mL/min and the gradient run time can be calculated by formula 4-4 with decreased initial concentration of organic solvent. The loading amount of crude extract should be controlled not to over 3 grams.

**Key words:** Marine microorganisms; Small molecule metabolites; Pretreatment; Macroporous resins; Preparation.

## 第一章 前言

### 1.1 海洋微生物小分子代谢产物

#### 1.1.1 海洋微生物的特点

海洋微生物生存于高压、缺氧、避光、低温、贫营养等特殊生境，其代谢产物具有化学结构多样性以及生物活性的多样性。海洋微生物生活在这样一个特殊生境中演化出了特殊的代谢途径，不但能产生与陆地微生物相同或相似的小分子代谢产物，而且还能产生陆地微生物不能产生的结构新颖、活性独特的代谢产物，因此海洋微生物资源成为发现化学结构新颖、生物活性多样<sup>[1]</sup>的发掘热点。海洋微生物是海洋生态系统中的重要组成部分，种类繁多，从海洋表层到海洋底泥均可以探测到微生物的踪迹。已知从深海中发现的微生物类群主要包括：真菌、放线菌、酵母、细菌、古细菌、病毒等<sup>[2]</sup>。

海洋微生物作为药物的生产者将无原材料的后顾之忧，可以利用现代微生物发酵技术大规模工业化生产源于海洋微生物的活性物质，保证资源的可持续利用。我国 2008 年开始启动海洋微生物资源的战略性勘探与挖掘，至目前为止，中国海洋微生物菌种保藏管理中心已经收集保藏了 10 万余株海洋微生物菌种，为新化合物的发现提供了重要资源保障。

#### 1.1.2 海洋微生物小分子代谢产物研究现状

20 世纪 40 年代后的不断发掘，海洋天然产物化学已是一个成熟的领域，自 1995 年以来，从传统原料中（如海藻和珊瑚）提取到新的代谢产物的数量日渐减少，而新研究不断表明，从海洋藻类和无脊椎动物体内提取的一些具有生物活性的小分子代谢产物也许是由其共附生的微生物产生的<sup>[3-7]</sup>，从海洋微生物中寻找新的代谢产物迅速成为研究热点。

自 1966 年 Burkholder<sup>[8]</sup> 等从波多黎各海域分离得到的食溴假单胞菌（*Pseudomonas bromotilis*）产生的含溴吡咯类抗生素硝吡咯菌素（Pyrolnitrin），标志着从海洋微生物分离抗生素的开始，但因为实验条件的限制，对于海洋微生物代谢产物的研究在 20 世纪才发展起来，根据 Scripps 研究所 Fenical 教授的报道，于 1995-1999 年间全世界的新化合物有 270 多种，而仅 2000-2001 两年间，

所报道的新化合物就接近这个数字了, 这些活性物质主要包括生物碱类、大环内酯类、肽类、萜类、吡喃酮类、甾体类和有机酸类等<sup>[9]</sup>。

Mitchell 等人<sup>[10]</sup>从海洋沉积物放线菌 *Streptomyces aureoverticillatus* 中分离得到一种具有抗肿瘤活性的化合物, 结构表明该化合物为结构新颖的大环内酰胺类物质。Furumait 等人<sup>[11]</sup>从海洋小单孢菌 TP-A0468 的培养液中分离得到一类醌环类抗生素 (Kosinostatin) 和异醌环素 B, Kosinostatin 对多种癌细胞有抑制作用。Koehn et al<sup>[12]</sup>从委内瑞拉水域的蓝绿藻巨大鞘丝中分离到一种结构新颖的脂肽 (Microcolin A), 是一种很强的免疫制剂。Capon 等人<sup>[13]</sup>从维多利亚 Lorne 海岸采集到的海洋放线菌 (MST-MA190) 培养液中分离到两个芳香氨基酸类化合物 (Lorneamides A 和 B), 活性研究结果显示, Lorneamides A 对枯草杆菌的 LD99 的质量浓度为 50 g/ mL, 具有中等抗生素活性。Charan 等人<sup>[14]</sup>从放线菌 *Micromonospora sp.* 中获得一种新型的生物碱化合物 [Diazepinomicin (1)], 研究表明, 该物质具有抗菌活性。Edrada 等人<sup>[15]</sup>报道了从海绵 *Xestospongia exigua* 体内的 *Penicillium cf. montanense* 发酵液中分离提取到十元大环内酯结构的活性物质 (Xestodecalatone A- C), 其中化合物 B 对白色念珠菌 *Candida albicans* 具有抑制作用。Botos I 等人<sup>[16]</sup>从一株海洋蓝细菌 (*Nostocellipsosporum*) 分离得到一个由 101 个氨基酸组成的抗 HIV 蛋白 —cyanovirin2N (CV2N), 它能阻断 HIV 对宿主细胞的黏附和入侵, CV2N 对不同株 HIV 均有显著的抑制活性。Mariadhas Valan Arasu<sup>[17]</sup>等人从印度普拉得什邦海域分离得到的链霉菌属 AP-123 菌株中分离出一种聚酮类化合物, 对革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌均有明显的抑制活性, 同时也具有一定的细胞毒性, 有望成为新的抗癌药物。Xiaochun Gao 等人<sup>[18]</sup>从北冰洋的泥沙中分离得到的放射菌类 BM-17 中分离出一种新的小分子代谢产物吩嗪类衍生物 (N- (2-hydroxyphenyl) -2-phenazinamine), 具有奇特的抗癌和抗真菌活性。

## 1.2 微生物发酵液的预处理

### 1.2.1 预处理的必要性

发酵结束后, 微生物发酵液的组成非常复杂, 通常情况下, 发酵液中目标物浓度很低, 同时存在大量菌体细胞、培养基及其水解产物、金属离子、生成的蛋白质和多糖等胶状物、色素等, 发酵液的黏度高, 影响固液分离速率, 同时影响

目标产物的提取。因此，对发酵液进行适当的预处理可除去大部分的杂质，提高固液分离速率，并减少目标产物的损失。袁丽峰等人<sup>[19]</sup>采用 $\beta$ -葡聚糖酶和非离子型聚丙烯酰胺联合使用处理去乙酰真菌环氧乙酯发酵液，使滤速提高80%，有效过滤体积增加50%。叶长等人<sup>[20]</sup>采用阴离子型聚丙烯酰胺A8025对西梭霉素发酵液进行预处理后，发酵液死端过滤常数比未经絮凝处理的发酵液死端过滤常数提高27.8倍，且在过滤过程中西梭霉素的损失减少了7.9%。

### 1.2.2 发酵液预处理方法<sup>[21]</sup>

发酵液的预处理方法主要有凝聚与絮凝技术、沉淀法、吸附法、酶解法等。其中凝聚与絮凝技术蛋白去除率高、预处理效果好、操作简便易行、能耗低、所用设备及药剂成本低廉<sup>[22]</sup>。其他方法的适用性不强，一般只针对某一种发酵液中某一确定代谢物的提取，单独使用时蛋白去除不彻底等各种缺点。例如加热法只适合热稳定的物质，调 pH 只适合 pH 稳定的化合物，沉淀法不能与待提取物发生反应等等。

#### (1) 凝聚与絮凝技术

凝聚作用 (coagulation) 是指在某些电解质作用下，使扩散双电层的排列电位降低 (即  $\zeta$  电位)，破坏胶体系统的分散状态，而使胶体粒子聚集的过程。胶粒能保持分散状态的原因就是带有相同电荷和扩散双电层的结构，胶体粒子在溶液中都存在扩散双电层的模型。发酵液中的细胞、菌体、细胞碎片以及蛋白质等胶体粒子表面都带有电荷，主要是吸附溶液中离子或自身基团的电离所致，通常带负电荷。如果在发酵液中加入具有相反电性的电解质，就能中和胶粒的电性，使  $\zeta$  电位降低。因此对于带负电性菌体的发酵液，阳离子的存在会促使  $\zeta$  电位迅速降低，由于热运动胶粒间相互碰撞而聚集起来。影响凝聚作用的主要因素是无机盐的种类、化合价以及无机盐用量。阳离子对带负电荷的胶粒凝聚能力的次序为： $\text{Al}^{3+} > \text{Fe}^{3+} > \text{H}^{+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{Li}^{+}$ ，常用的凝聚剂有： $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ； $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ； $\text{FeCl}_3$ ； $\text{ZnSO}_4$ ； $\text{MgCO}_3$  等。

絮凝作用 (flocculation) 是指在某些高分子絮凝剂存在下，在悬浮粒子之间产生架桥作用而使胶粒形成粗大的絮凝团的过程。絮凝剂包括天然絮凝剂、有机合成高分子絮凝剂和无机高分子聚合物。天然有机高分子絮凝剂包括多糖类物质 (如壳聚糖及衍生物)、海藻酸钠、明胶和骨胶。有机高分子絮凝剂主要包括聚丙烯酰胺类衍生物、聚苯乙烯类衍生物和聚丙烯酸类等，常用的无机高分子聚合物有聚

合铝盐和聚合铁盐。影响絮凝效果的因素主要有絮凝剂的分子量、絮凝剂用量、溶液 pH，溶液温度，搅拌速度和时间。

对于带负电性的菌体或蛋白质，常采用有机高分子絮凝剂与无机电解质絮凝剂搭配使用，先加入无机电解质使胶体粒子脱稳迅速聚集成微粒，然后加入絮凝剂使形成的微粒聚集成絮凝团。无机电解质的凝聚作用为高分子的架桥作用创造条件，两者相辅相成，提高絮凝效果。凝聚与絮凝能有效的改变发酵液的性质，提高过滤速率、有效除去蛋白质和固体杂质，提高滤液质量<sup>[23]</sup>。赵彦修，张漏茜<sup>[24]</sup>采用硫酸铝和聚丙烯酰胺处理赤霉素发酵液，大大改善了发酵液的固液分离效果，使滤液浓缩后的沉淀量减少了 3 分之二，乳化现象也明显得到改善。

### (2) 沉淀法

沉淀法主要用来去除发酵液中的杂蛋白，包括等电点沉淀、变性沉淀、加入沉淀剂。等电点沉淀是利用蛋白质处于等电点状态时溶解度最小而使其沉淀除去。有些蛋白质在等电点仍有一定的溶解度，单靠等电点的方法还不能将其大部分沉淀除去。变性沉淀是利用蛋白质变性后溶解度较小而产生沉淀的原理将蛋白除去，最常用的是加热。但加热变性的方法只适合热稳定的物质。而海洋微生物活性物质的热稳定性不强。还可以大幅度改变 pH，加有机溶剂。大幅度改变 pH 容易使代谢物质不稳定，加入有机溶剂质适合后续提取方法采用的是溶剂萃取法，否则会影响后续的分离。加入沉淀剂是利用某些化学试剂能与蛋白质结合形成复合物沉淀，只是针对提取某一特定的代谢产物，且不能与化学试剂发生化学反应。曾凡佳等人<sup>[25]</sup>利用酸处理与加热的方法处理克雷伯士肺炎杆菌 TUAC01 产 1, 3-丙二醇发酵液，处理后滤液 OD<sub>650</sub> 值降低了 99.9%，蛋白含量降低了 98%-99%。

### (3) 吸附法

利用吸附作用常能除去杂蛋白。在发酵液中加入一些反应剂，它们互相反应生成的沉淀物对蛋白质具有吸附作用而使其凝固。产生的沉淀物既能吸附杂蛋白和菌体等胶状悬浮物，还能起助滤作用。但发酵液中蛋白质等固体粒子通过吸附作用只能除去一部分，不彻底，并且不能与待提取的物质发生反应，仅针对从发酵液中提取已确定的某种代谢产物。

### (4) 酶解法



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库